基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0899-04

近紫外线对兔晶状体上皮细胞 Cx43 蛋白影响的研究

彭艳丽,李 立,汤永强
(重庆医科大学附属第二医院眼屈光矫治中心,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨近紫外线抑制兔晶状体上皮细胞通讯功能的机制。方法:将兔晶状体前囊膜行组织块细胞培养,2~3 代细胞分为正常对照组和近紫外线照射组(同一近紫外线光源下一固定位置 50 cm,测得该点的功率为 0.2 mW/cm²,给于同一强度,5、10、15 min 不同时间的近紫外线照射),应用 Western-blot 方法,从翻译水平检测近紫外线对兔晶状体上皮细胞(Rabbit lens epithelia cells,RLECs)的连接蛋白 43(Connexin43,Cx43)表达变化的影响;采用间接免疫荧光染色法,对 RLECs 的 Cx43 蛋白进行定位分析。结果:Cx43 蛋白在各组晶状体上皮细胞中均有表达,并且正常对照组为高表达,随着近紫外线照射时间的增加,其 Cx43 蛋白的表达逐渐降低;并经近紫外线照射后正常定位于晶状体上皮细胞膜上的 Cx43 发生了内移。结论:证实近紫外线抑制晶状体上皮细胞通讯功能的机制可能与细胞缝隙连接通讯(Gap junction-mediated intercellular communication,GJIC)的关键蛋白 Cx43 蛋白表达的下降和功能定位的改变有关。

【关键词】近紫外线;晶状体上皮细胞;缝隙连接细胞通讯;Cx43 蛋白;蛋白印迹法
【中国图书分类法分类法】R776.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-08

Research of UVA in affecting Cx43 protein among rabbit lens epithelia cells

PENG Yan-li, et al
(*Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To probe the mechanism of inhibition in gap junction-mediated intercellular communication (GJIC) of rabbit lens epithelia cells (RLECs) irradiated by UVA. *Methods*:RLECs of 2~3 generation were divided into normal control group and ultraviolet irradiation group (The UV intensity was 0.2 mW/cm2 under a UV lamp with fixed position 50 cm, RLECs were exposed to ultraviolet lamp at different times: 5,10,15 minutes). Western blot techniques were employed to detect the protein levels of Cx43 irradiated by UVA. By indirect immunofluorescence histochemistry we analyzed the localization of Cx43 in the RLECs. *Results*:In UVA irradiation group and normal control group,there was expression of Cx43. With the increasing intensity,the expression of Cx43 was decreasing. The immunnostaining of Cx43 in RLECs revealed that the internalization of Cx43 from membrance to plasma and nuclear was found in UVA irradiated RLECs. *Conclusion*: Cell molecule level study proved UVA irradiation can reduce GJIC of RLECs,which wis associated with perturbations in localization and number of Cx43 among RLECs.

【Key words】Ultraviolet A(UVA);Lens epithelia cell;Gap junction-mediated intercellular communication;Connexins43;Western Blot

缝隙连接细胞间通讯(Gap junction-mediated intercellular communication,GJIC)是相互接触的相邻细胞间的一种信息通讯,在调节细胞增殖、分化及维持组织内环境的稳态等过程中起着十分重要的作用[1],而它与白内障发生的关系是白内障研究领域一个新的热点,兴起于近几年,研究处起始阶段。连接蛋白 43(Connexin43,Cx43)是晶状体上皮细胞的缝隙连接的主要表达蛋白,本部分通过实验研究近紫外线对 Cx43 数量和功能定位改变,初步从分子水平探讨近紫外线抑制晶状体上皮细胞缝隙连接通讯功能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:2~3 月龄新西兰健康白色家兔 20 只,体质量 1.5~2.5 kg,无眼疾,雌雄兼用(重庆医科大学实验动物中心提供)。

实验用药及主要试剂:紫外线照射灯(上海亚源照明电器有限公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美国

作者介绍:彭艳丽(1977-),女,住院医师,硕士,研究方向:眼屈光及白内障。
通讯作者:李 立,男,教授,E-mail:liliyanke@sina.com。
基金项目:重庆市卫生局科研项目(编号 06-2-195)。

Promega 公司);兔抗 Cx43 多克隆抗体(Santa Cruze 公司);4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗、异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate,FITC)- 羊抗兔 IgG 抗体、DAB 试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 将兔晶状体上皮组织放入培养液中,置于 37℃,50 ml/L CO_2 培养箱内孵育,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化并接种至培养皿中,按 1:2 的比例进行传代培养,采用 2~3 代细胞进行实验。实验随机分为 4 个组:正常对照组(不给予任何处理因素),5 min 照射组,10 min 照射组和 15 min 照射组(根据近紫外线照射时间的不同)。紫外灯光谱范围为 320~400 nm,峰值为 365 nm,照射强度为 0.2 mW/cm²。

1.2.2 Western blotting 测定 RLECs 中 Cx43 蛋白的表达 培养于 100 ml 培养瓶中的晶状体上皮细胞,加入 0.5 ml 细胞裂解液,刮下细胞,放入低温离心机中 12 000 r/min 离心 30 min,取上清;灌制 SDS 聚丙稀酰胺凝胶,依次上样实验组、对照组以及中分子量 marker,每孔上样量为 30 μl,90 V 恒压电泳约 15 min,待染料前沿进入分离胶后将电压提高至 120 V,恒压电泳约 2 h,直至溴酚蓝进入电泳缓冲液后,关闭电源;使用 Bio-Rad 半干转移仪(Bio-Rad laboratories, Ine. California. USA)。湿转至 PVDF 膜上;膜加用封闭液稀释(1:1 000)的兔抗 Cx43 多抗室温摇动温育 1 h;用 TBST 室温洗膜 15 min1 次,共 3 次。加入用封闭液稀释(1:1 000)HRP 标记的羊抗兔 IgG 室温温育 1 h。再用 TBST 室温洗膜 15 min 1 次,共 3 次;将显色液立即加入 PVDF 膜上,当条带充分显色后,照相保存,用 Quantity one 软件分析系统获取转印膜上的染色密度值。

1.2.3 免疫荧光细胞化学法检测晶状体上皮细胞 Cx43 蛋白的功能定位情况 将单层生长的细胞爬片,给予近紫外线处理以后,PBS 液洗涤 3 次;预冷的纯丙酮固定 15 min;PBS 漂洗 5 min,3 次;封闭血清孵育 30 min;加入一抗(Cx43,1:100),4℃过夜;PBS 漂洗 5 min,3 次;加入二抗(FITC- 羊抗兔 IgG 抗体,1:150),室温孵育 60 min,避光;PBS 漂洗 5 min,避光,3 次;加入 DAPI,室温孵育 15 min,避光;PBS 漂洗 5 min,避光,3 次;50%缓冲甘油封片。PBS 代替一抗,其余步骤相同设为阴性对照。采用 OlympusBX51 荧光显微镜及摄像系统检测待检标本。检测 FITC 标记的抗体,采用 WB 系统(激发滤色镜 450~480 nm;吸收滤色镜 515 nm);检测 DAPI 采用 WU 系统(激发滤色镜 330~380 nm;吸收滤色镜 420 nm);分别摄像后,利用 SPOT3.4 软件进行同一视野不同荧光通道的重叠。观察滤色荧光的表达情况。

1.3 统计学分析

所有数据均用 SPSS13.0 处理,计量资料数据以表示,各组数据均经正态检验及方差齐性检验,多组间参数比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用 SNK-q 检验分析;$P<0.05$ 即认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 近紫外线对 Cx43 蛋白表达的影响

Western Blot 分析 Cx43 蛋白的表达水平(见图 1),用单因素方差分析及 SNK-q 进行两两之间分析,表 1 结果发现与正常对照组比较,5 min 照射组 Cx43 蛋白含量有轻度降低,差异无统计学意义($P>0.05$);而 10 min 照射组及 15 min 照射组 Cx43 蛋白含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$);在实验组中,两两之间进行比较,Cx43 蛋白含量差异也有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 各组间 Cx43 蛋白的表达水平(染色密度 INTmm²)

实验分组	Cx43 蛋白的表达量(INTmm²)
正常对照组	87 607.450 ± 5 050.795
5 min 照射组	82 560.880 ± 4 478.844*
10 min 照射组	40 762.430 ± 3 561.339**
15 min 照射组	12 780.810 ± 1 612.362**

*:$P>0.05$ 与正常对照组比;**:$P<0.01$ 与正常对照组比

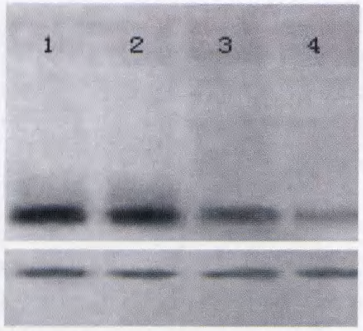
2.2 近紫外线对 Cx43 蛋白功能定位的影响

FITC 荧光标记的山羊抗兔 Cx43 与兔晶状体上皮细胞 Cx43 结合后在激发光的作用下显示绿色荧光,DAPI 标记晶状体上皮细胞核在激发光作用下显示蓝色荧光。结果显示:正常对照组 Cx43 的表达呈现较强的 FITC 绿色荧光,均匀分布于细胞膜上,数量较多(图 2);5 min 照射组的 FITC 荧光产物分布于胞膜和胞浆内,强度轻度减弱(图 3);而 10 min 照射组及 15 min 照射组的 FITC 绿色荧光明显减弱,聚集在胞核周围及胞核上(图 4、5);阴性对照的荧光染色呈阴性(图 6)。

3 讨 论

老年性白内障的发病机制及其药物防治一直是白内障领域关注的热点。国内外大量学者已从紫外线对晶状体氧化损伤方面探讨了紫外线与白内障的关系,同时也有学者发现:晶状体在无氧条件下受紫外线辐射也会出现离子平衡紊乱和混浊,因此认为非氧化机制在其中也起重要作用,但其过程尚不清楚。

晶状体细胞 GJIC 功能与晶状体生理、病理状态的关系是目前白内障研究领域的一个新的方向。缝隙连接(Gap junction,GJ)最早是由 Furshpan 和



1. 正常对照组；
2. 5 min 照射组；
3. 10 min 照射组；
4. 15 min 照射组

图 1　各组 RLECs 中 Cx43 蛋白及 β-action 的含量



图 2　正常对照组 RLECs Cx43 的表达，绿色荧光反应产物主要分布于胞膜上(间接免疫荧光方法×200)

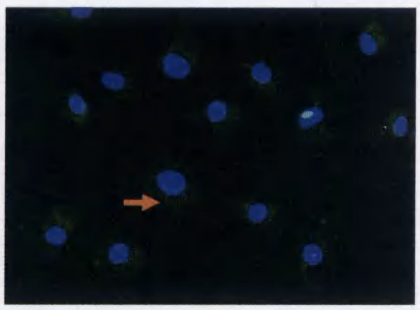


图 3　近紫外线 5 min 照射组 RLECs Cx43 的表达，绿色荧光反应产物主要分布于胞膜和胞浆上(间接免疫荧光方法×200)

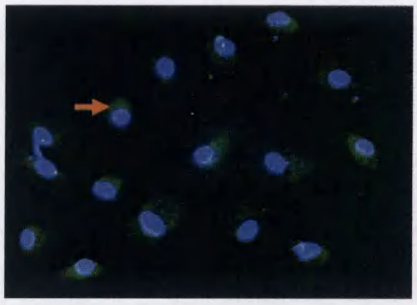


图 4　近紫外线 10 min 照射组 RLECs Cx43 的表达，绿色荧光反应产物主要分布于胞核周围(间接免疫荧光方法×200)

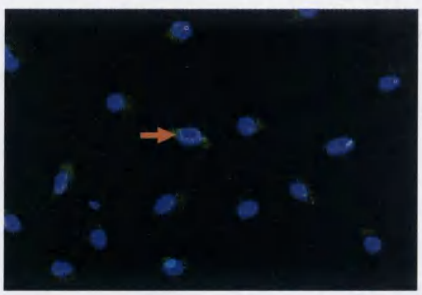


图 5　近紫外线 15 min 照射组 RLECs Cx43 的表达，绿色荧光反应产物主要分布于胞核周围(间接免疫荧光方法×200)

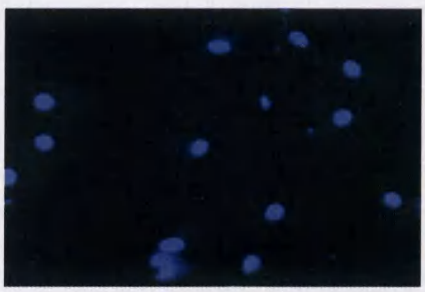


图 6　阴性对照的绿色荧光呈阴性(间接免疫荧光方法×200)

Potter 在研究小龙虾轴突低阻力电传导通路时发现的[2]，其组成结构为缝隙连接蛋白(Connexin，Cx)。它允许细胞之间能直接进行离子和小分子物质(< 1000 D)的交换，对细胞内稳态的维持等方面起着非常重要的作用[3]。晶状体是无血管的透明组织，由于缺乏血供，晶状体上皮细胞之间以及上皮细胞与纤维细胞之间是通过 GJIC 进行营养物质的运输、代谢产物的排泄和晶状体各种成分之间渗透性平衡调节[4]，从而维持晶状体透明性。到目前为止，在人类和动物的晶状体内连接蛋白主要分为 Cx43、Cx44、Cx46、Cx45.6、Cx49、Cx50、Cx56 几类，而 Cx43 主要在晶状体上皮细胞中表达来控制晶状体的发育和组织生长[5,6]，国外一些学者研究发现 Cx 发生缺失和突变后，将导致白内障的形成[7-9]。

在前期实验研究中我们采用荧光光漂白恢复技术(Fluorescence redistribution after photobleaching，FRAP)，通过激光共聚焦显微镜检测各组兔晶状体上皮细胞的缝隙连接通讯功能变化情况。结果发现近紫外线照射能降低兔晶状体上皮细胞缝隙连接通讯功能，并且随着照射时间的增加，其功能下降越明显，但其发生机制目前尚不清楚。

有研究表明：任何 Cx43 位置与数量的改变都影响着 GJIC 功能[10]。在肿瘤细胞中，Cx43 的表达降低甚至缺失会使细胞间通讯异常，从而导致细胞过度的克隆生长。有人对 Cx43 定位进行了测定，发现相邻细胞连接处有明亮的斑点状标记，聚集分布连接成线，证实了有功能的 Cx43 位于细胞膜上[11]。因此，对于近紫外线抑制晶状体上皮细胞 GJIC 功能的机

理初步研究,我们直接从晶体上皮细胞 GJIC 的功能蛋白-Cx43 入手,分析其在翻译水平(包括蛋白的表达及细胞的定位分布)等方面的变化。首先我们采用免疫印迹法对 Cx43 蛋白进行定量分析,结果发现:与正常对照组比较,5 min 照射组 Cx43 蛋白含量轻度降低,无统计学差异($P>0.05$);而 10 min 照射组及 15 min 照射组 Cx43 蛋白含量明显降低,有显著性差异($P<0.01$);我们推测近紫外线诱导 GJIC 功能的下调的机制不完全是通过降低连接蛋白表达水平途径来实现的,还有其他机制的影响。因此进一步对 Cx43 蛋白进行了荧光免疫标记定位,为了确定所有实验细胞中 Cx43 蛋白是定位在核内还是细胞浆内或膜上,我们进行了复染,即在 FITC 标记 Cx43 蛋白的基础上,再用 DAPI 标记细胞核,在激发光的作用下显示蓝色荧光。结果显示:正常对照组 Cx43 蛋白的表达呈现较强的 FITC 绿色荧光,较均匀分布于细胞膜上,数量较多;5 min 照射组的 FITC 荧光产物分布于胞膜和胞浆内,强度轻度减弱,即仍有一定数量的有功能的细胞缝隙连接蛋白;而 10 min 照射组及 15 min 照射组的 FITC 绿色荧光明显减弱,聚集在胞核周围及胞核上;即近紫外线照射可以改变 RLECs 的 Cx43 蛋白的定位,使其从正常的功能位置-细胞膜移向细胞浆及细胞核内。推测近紫外线抑制晶状体上皮细胞 GJIC 功能可能与 Cx43 的内移有关。这也进一步说明了 5 min 照射组 Cx43 蛋白的数量在总体上虽然与正常对照组相比无统计学差异,但由于其功能定位发生了改变,不在正常的功能位置上,不能发挥其应有的功能,即是说有功能的 Cx43 蛋白数量减少,从而也导致 GJIC 功能的下降。

本实验仅从连接蛋白的翻译水平上进行了机制的初步探讨,事实上,GJIC 的调控因素还有很多,可能与连接蛋白基因突变、基因 mRNA 转录、翻译后的修饰(磷酸化水平[12,13])以及缝隙连接的数量和启闭等有关。特别是磷酸化水平显得尤为重要,因此,从连接蛋白磷酸化水平进一步探讨近紫外线抑制晶状体上皮细胞 GJIC 功能的机制,并且进一步研究 GJIC 功能的抑制导致白内障的发生与其他老年性白内障的发生机制(如氧化损伤学说及凋亡学说)之间的关联是十分必要。这将为老年性白内障的发病机制提出一个新的理论依据,为以后白内障的药物防治开创了一条全新的思路,必然会产生一定的社会和经济效益。

参 考 文 献

[1] Krutovskikh V A, Troyanovsky S M, piccoli C, et al. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction prtein connexin43 on tumor cell growth in vivo[J]. Oncogene, 2000, 19(14): 505-513.

[2] Warner A. Gap junctions in development a perspective[J]. Semin Cell Biol, 1992, 3(1): 81-91.

[3] Wang H Y, Yu Y B. The genetics research of the congenital cataract [J]. Int J Ophthalmol, 2007, 7(6): 1375-1378.

[4] Goodenough D A. The crystalline lens: a system networked by gap junctional intercellular communication [J]. Semin Cell Biol, 1992, 3 (1): 49-58.

[5] Gupta V K, Berthoud V M, Atal N, et al. Bovine connexin44, a lens gap junctionprotein: molecular cloning, immunologic characterization, and functional expression [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(10): 3747-3758.

[6] Gu S, Yu X S, Yin X, et al.Stimulation of lens cell differentiation by gap junction protein connexin45.6 [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (5): 2103-2111.

[7] Gao Y, Spray D C. Structural changes in lenses of mice lacking the gap junction protein connexin43[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39 (7): 1198-1209.

[8] White T W, Sellitto C, Paul D L, et al. Prenatal lens development in connexin 43 and connexin 50 double knockout mice[J]. Invedt Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42 (12): 2916-2923.

[9] Gong X, Baldo G J, Kumar N M, et al. Gap Junctional coupling in lenses lacking alpha3 connexin[J]. Proc Natl Acad Sic USA, 1998, 95(26): 15303-15308.

[10] Aoumari A, Fromaget C, Dupont E, et al. Conservation of a cytoplasmic carboxy-terminal domain of connexins 43, a gap junctional protein, in mammal heart and brain[J]. J Membr Biol, 1990, 115(3): 229-240.

[11] 毛国根,曾群力,叶少青. 二氧化硅致肺成纤维细胞连接蛋白 Cx43 定位的改变[J].中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19(5): 354-356.

[12] Feijter A W D, Matesic D F, Ruch R J, et al. Localization and function of the connexin 43 gap-junction protein in normal and various oncogene-expressing rat liver epthelial cells[J]. Molecular Carcinogenesis, 1996, 16 (4): 203-212.

[13] Matesic D F, Rupp H L, Bonney W J, et al.Changes in gap-junction pemeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumeor promoters in rat liver epithelial cells [J].Molecular carcinogenesis, 1994, 10(4): 226-236.

(责任编辑:冉明会)